

*Research Article*

**Perancangan Primer Spesifik Subspesies Berbasis Gen Endoglukanase  
untuk Deteksi *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii***

***Development of Novel Subspecies-Specific Primers Based on the Endoglucanase Gene  
for Detection of *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii****

**Bambang Trianom<sup>1)</sup>, Triwidodo Arwiyanto<sup>2)</sup>, & Tri Joko<sup>2)\*</sup>**

<sup>1)</sup>Balai Karantina Pertanian Bandar Lampung

Jln. Soekarno-Hatta km. 7, Bandar Lampung, Lampung 35241

<sup>2)</sup>Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

Jln. Flora No. 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta 55281

\*Penulis untuk korespondensi. E-mail: tjoko@ugm.ac.id

Diterima 18 Januari 2018; diterima untuk diterbitkan 28 Mei 2018

**ABSTRACT**

*Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* that belong to *Ralstonia solanacearum* species complex is the cause of Sumateran disease of clove. The disease was reported to cause widespread devastation on clove plantings in Indonesia. One of the control strategies is to reduce the spread of the disease through early detection on clove seedlings. The study aimed to design the specific primers based on endoglucanase (*egl*) gene of *R. syzygii* subsp. *syzygii* as a tool for early diagnosis. The analyses were conducted on development of specific primers design using *egl* sequences retrieved from GenBank, Polymerase Chain Reaction (PCR), primers sensitivity and specificity test. The pair of primers UGMRss-F (5'-GCT CACCATCGC CAAGGACAGCG-3') and UGMRss-R (5'-TTCGATCGAACGCCTGGTTGAGC-3') could amplify *R. syzygii* subsp. *syzygii* at ~378 base pairs with 0.8 ng/μl minimum concentration of DNA. The primers was specific to *R. syzygii* subsp. *syzygii* but not to other bacterial species even in the same phylotype.

**Keywords:** clove, endoglucanase, *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*, specific primer, Sumatera disease

**INTISARI**

*Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* merupakan bakteri yang termasuk dalam kelompok *Ralstonia solanacearum* species complex yang menyebabkan penyakit Sumatera pada tanaman cengkih. Penyakit ini menyebabkan kerugian yang sangat besar dan sampai saat ini belum ditemukan cara pengendalian yang efektif. Salah satu upaya pencegahan penyakit adalah melalui deteksi dini dan mencegah penyebaran penyakit melalui peredaran bibit dari areal yang endemis. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik berbasis gen endoglukanase (*egl*) sebagai upaya deteksi dini penyakit Sumatera. Analisis yang dilakukan meliputi desain primer spesifik dengan menggunakan data sekuens gen *egl* dari GenBank, Polymerase Chain Reaction (PCR), uji kepekaan primer dan uji kekhususan primer. Desain primer yang berhasil dirancang terdiri dari UGMRss-F (5'- GCTCACCATCGCCAAGGACAGCG-3') dan UGMRss-R (5'-TTC GATCGAACGCCTGGTTGAGC-3') dengan ampikon ~378 pasang basa. Pada konsentrasi DNA 0,8 ng/μl, secara peka *R. syzygii* subsp. *syzygii* masih dapat teramplifikasi dengan baik. Primer ini juga hanya dapat mendeteksi *R. syzygii* subsp. *syzygii* dan tidak untuk bakteri lain bahkan pada filotipe yang sama.

**Kata kunci:** cengkih, endoglukanase, penyakit Sumatera, primer spesifik, *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*.

**PENDAHULUAN**

Produksi cengkih dari tahun ke tahun mengalami penurunan, salah satunya karena adanya penyakit Sumatera (*Sumatra disease of clove*) yang disebabkan oleh *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* (Bennet *et al.*, 1985). Tanaman cengkih yang terserang patogen tersebut daunnya gugur secara mendadak, kemudian ranting-ranting pada bagian pucuk mengalami kematian. Percabangan atau seluruh tanaman kadang-

kadang layu mendadak dan mengakibatkan daun menjadi kering. Daun pada ujung bagian ranting mengalami kerontokan sehingga terlihat gundul pada ujung-ujung ranting, sedangkan daun-daun yang lebih tua tetap kelihatan segar (Danaatmadja *et al.*, 2009). Gugurnya daun dapat berlangsung beberapa minggu sampai beberapa bulan. Kematian tanaman cengkih akibat penyakit ini dapat berlangsung cepat yaitu antara 3–12 bulan atau lambat yaitu antara

1–6 tahun. Umumnya pohon dewasa yang terlebih dahulu terserang (Eden-Green *et al.*, 1992).

Penyebaran penyakit Sumatera dari suatu daerah ke daerah lain sulit dideteksi karena gejalanya mirip dengan kekurangan air atau karena penyakit lain, sehingga pada saat musim penghujan baru diketahui bahwa tanaman terkena penyakit Sumatera. Upaya pengendalian sudah banyak dilakukan, akan tetapi belum mendapatkan hasil yang maksimal (Dwimartina *et al.*, 2017). Salah satu cara pengendalian yang dapat dilakukan antara lain mencegah pengirimannya bibit dari daerah endemis ke daerah yang masih bebas penyakit (Widyaningsih *et al.*, 2017; Safni *et al.*, 2018). Deteksi dini *R. syzygii* subsp. *syzygii* baik di areal pertanaman yang sudah terserang maupun penyebarannya melalui peredaran bibit dari areal yang endemis penyakit ke daerah non-endemis diharapkan dapat mencegah penyebaran penyakit.

Faktor virulensi dari bakteri patogen di antaranya adalah produksi berbagai enzim ekstraselular seperti  $\beta$ -1,4-endoglukanase, poligalakturonase, pektin metil esterase, pektat liase, dan beberapa enzim lainnya (Liu *et al.*, 2005; Joko *et al.*, 2018). Enzim ini memainkan peran penting dalam patogenitas patogen dengan peningkatan penetrasi jaringan inang melalui degradasi komponen dinding sel tanaman. Endoglukanase dilaporkan menjadi faktor penting dalam virulensi *R. solanacearum* (Roberts *et al.*, 1988; Arwiyanto, 2013). Gen yang menyandi enzim  $\beta$ -1,4 endoglukanase (*egl*) telah digunakan untuk mengklasifikasikan *Ralstonia solanacearum* species complex (RSCC) menjadi empat kelompok filotipe (Fegan & Prior, 2005).

Deteksi dan identifikasi bakteri patogen dapat dilakukan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) melalui amplifikasi gen spesifik. Teknik PCR merupakan salah satu cara deteksi yang lebih akurat dibandingkan dengan cara konvensional atau dengan menggunakan teknik serologi (Windari *et al.*, 2015; Ismiyatuningsih *et al.*, 2016). Salah satu gen universal yang umum digunakan untuk identifikasi bakteri adalah gen 16S rRNA, akan tetapi gen 16S rRNA memiliki tingkat evolusi yang lambat sehingga seringkali belum dapat memisahkan takson di bawah spesies (Joko *et al.*, 2014; Poretsky *et al.*, 2014). Penggunaan gen *housekeeping* telah banyak digunakan dalam analisis filogenetik bakteri patogen termasuk pada RSCC. Hubungan filogenetik dalam dan di antara empat filotipe *R. solanacearum* menggunakan analisis sekuensing kekerabatan gen yang

berbeda, termasuk *egl*, *hrpB*, *gdhA*, *adk*, *gyrB*, *gapA*, *ppsA* dan *fliC*, dan 16S-23S wilayah ITS menunjukkan pemisahan RSCC menjadi beberapa kelompok yang terdiri dari *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii* subsp. *syzygii*, *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, dan *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* (Safni *et al.*, 2014). Gen *egl* pada RSCC memiliki homologi yang cukup variatif sehingga menggunakan gen *egl* sebagai marka molekular sangat menjanjikan, di antaranya untuk merancang primer spesifik. Penggunaan primer spesifik yang tepat merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam melakukan deteksi secara molekuler dengan PCR. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik berbasis sekuens gen *egl* yang dapat membedakan kelompok bakteri di bawah tingkat spesies (subspesies), khususnya untuk deteksi dan identifikasi *R. syzygii* subsp. *syzygii*.

## BAHAN DAN METODE

### Isolat Bakteri

Isolat *R. syzygii* subsp. *syzygii* yang diisolasi dari jaringan tanaman cengkih asal Kendal, Jawa Tengah (Trianom *et al.*, *in press*) secara rutin dibiakkan pada medium *Casamino Acid* (CA) yang ditambahkan iron salts (CA+; g/l): acid casein hydrolysate (oxoid) 7,5; sucrose, 2,0; magnesium sulphate, 0,25; di-potassium hydrogen phosphate, 0,5; Bacto agar (Difco), 15,0; ferric ammonium citrate, 0,25 (Schaad *et al.*, 2001). Selanjutnya kultur bakteri yang tumbuh diinkubasikan selama 5–7 hari pada suhu ruang ( $\pm 27^\circ\text{C}$ ) dan secara periodik koloni tunggalnya ditumbuhkan pada medium CA yang baru untuk menjaga viabilitas dan kemurnian isolat (Joko *et al.*, 2000; Nurjanah *et al.*, 2017).

### Ekstraksi DNA *R. syzygii* subsp. *syzygii*

Bakteri diisolasi DNANYa dengan teknik *mini-preparation DNA isolation* menurut Joko *et al.* (2011a). Sebanyak 1,5 ml kultur sel disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 2 menit. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensi dalam 540  $\mu\text{l}$  TE buffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA pH 8) lalu ditambahkan 30  $\mu\text{l}$  10% SDS dan diinkubasikan pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 60 menit, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  5 M NaCl, dan 80  $\mu\text{l}$  CTAB/NaCl, kemudian dihomogenkan dan diinkubasikan pada suhu  $65^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 750  $\mu\text{l}$  chloroform : isoamylalcohol (24:1) dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas yang terbentuk dipindahkan ke tabung 1,5 ml eppendorf

yang baru kemudian ditambahkan 600 µl phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung eppendorf yang baru. Selanjutnya ditambahkan 0,6× volume isopropanol dan disentrifugasi kembali pada 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol 70% dan dikeringanginkan kemudian diresuspensi dalam 30 µl buffer Tris-EDTA.

### **Desain Primer Berbasis Gen Endoglukanase**

Sebelum merancang primer spesifik, perlu dipastikan terlebih dahulu tingkat konservasi gen endoglukanase *R. syzygii* subsp. *syzygii* dengan gen endoglukanase bakteri lainnya. Sekuen gen endoglukanase *R. syzygii* subsp. *syzygii* dan bakteri lain dapat diunduh dari *GenBank Nucleotide database* yang selanjutnya diselaraskan menggunakan program Multalin yang dapat diunduh di <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>. Untuk mengetahui tingkat konservasinya digunakan program Genetix-Win Versi 4. Tingkat konservasi yang rendah antara sekuen gen endoglukanase *R. syzygii* subsp. *syzygii* dengan bakteri lainnya menunjukkan bahwa gen endoglukanase dapat digunakan sebagai penanda molekuler yang spesifik. Primer yang dirancang terdiri dari primer forward dan reverse. Sifat primer yang dirancang, termasuk suhu leleh ( $T_m$ ), kandungan GC, potensi dimmer dan pembentukan *hairpin loop* dihitung dengan menggunakan *oligocalc* yang dapat diakses melalui <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

Setelah didapat rancangan primernya, lalu diverifikasi dengan menggunakan program genetix-Win version 4. Verifikasi diperlukan untuk mengetahui apakah primer yang dirancang juga dapat mengamplifikasi DNA dari spesies *R. syzygii* lainnya.

### **Amplifikasi DNA *R. syzygii* subsp. *syzygii***

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan primer spesifik yang telah dirancang. Reaksi PCR menggunakan *Master Mix Go Taq Green* (Promega) dengan komposisi 12,5 µl Master mix 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, 1 µl DNA dan 9,5 µl *Nuclease Free Water* (NFW). Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan mesin PCR (Biorad T100, Jerman) pada suhu 96°C selama 5 menit untuk denaturasi awal. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dengan tahapan sebagai berikut: proses denaturasi pada suhu

94°C selama 15 detik, proses penempelan (*annealing*) pada suhu 59°C selama 30 detik, dan proses pemanjangan pada suhu 72°C selama 30 detik. Kemudian dilanjutkan dengan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Akhir siklus dipertahankan pada suhu 4°C (Joko *et al.*, 2007a; Handiyanti *et al.*, 2018).

Hasil amplifikasi dianalisis untuk melihat fragmen DNA melalui elektroforesis menggunakan gel agarose 1% dalam buffer TBE (Tris-HCL, boric acid, EDTA) 1× pada tegangan 50 Volt DC selama 50 menit. Pengukuran fragmen DNA menggunakan penanda 100 bp DNA ladder (Promega). Sampel disiapkan dengan mencampurkan 5 µl DNA, 2 µl gel red 1% kemudian diisikan dalam sumuran gel sebanyak 7 µl. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan gel doc (Bio-Rad) (Mahfut *et al.*, 2016; Suharti *et al.*, 2017).

### **Pengujian Kekhususan (Specivity) dan Kepekaan (Sensitivity) Primer**

Untuk menguji kekhususan primer UGMRss dalam mendeteksi *R. syzygii* subsp. *syzygii*, pasangan primer ini diuji terhadap beberapa spesies bakteri lainnya yang berbeda antara lain *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, *R. pseudosolanacearum*, *Acidovorax citrulli*, *Xanthomonas citri*, *Pantoea stewartii*, *Dickeya chrysanthemi*, dan *Pectobacterium carotovorum*.

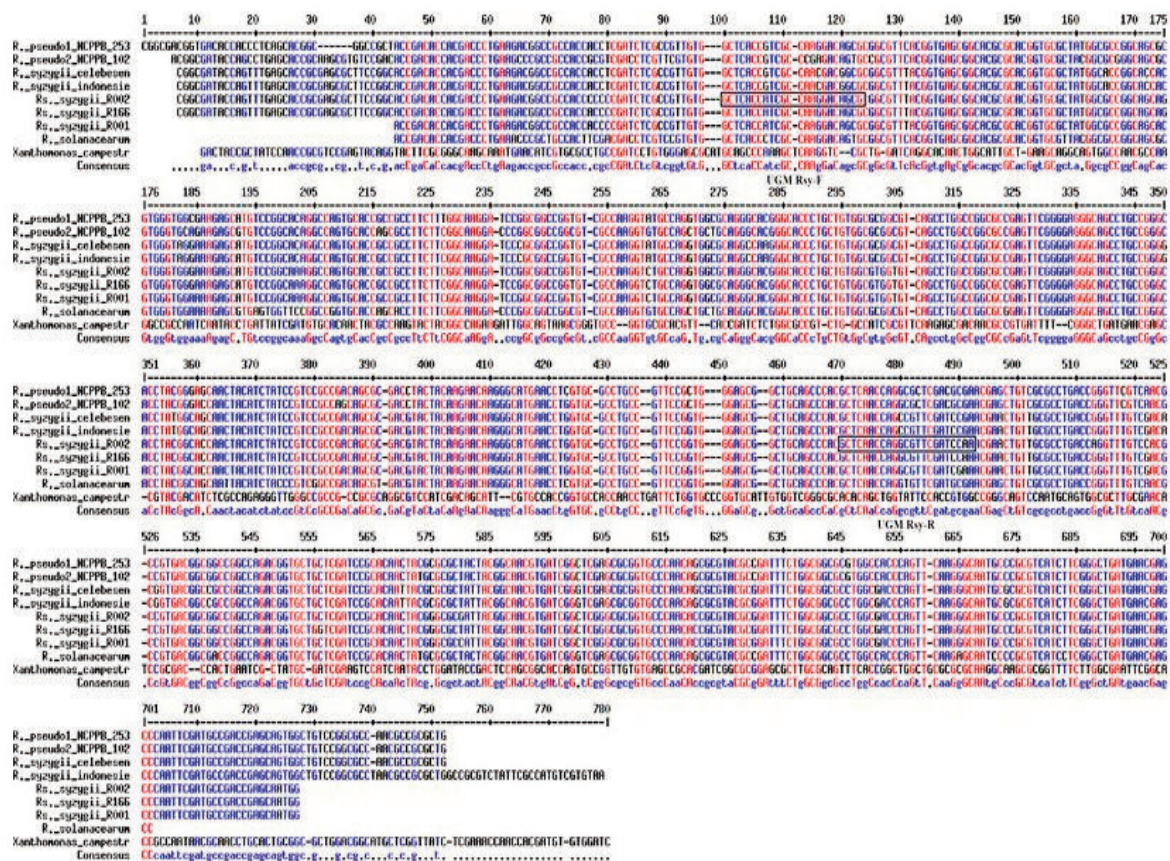
Uji kepekaan diperlukan untuk mengetahui seberapa peka primer dalam mendeteksi konsentrasi DNA bakteri target, dalam hal ini dengan menggunakan DNA kontrol. Pengujian dilakukan dengan serangkaian pengenceran, yaitu: DNA kontrol (suspensi DNA tanpa pengenceran), pengenceran 5×, 10×, 20×, 50×, 100×, 200×, dan 500×. Sebelum dilakukan pengenceran, konsentrasi DNA kontrol harus diukur terlebih dahulu menggunakan spektrofotometer (Genesys 10S UV-vis, Thermo Scientific). Pengukuran dilakukan pada OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (Joko *et al.*, 2007b).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Desain Primer Berdasarkan Gen Endoglukanase**

Desain primer dilakukan dengan menyelaraskan terlebih dahulu urutan basa gen *egl* agar dapat dilihat perbedaan pada bagian tertentu *R. syzygii* subsp. *syzygii* dengan bakteri lainnya (Gambar 1). Dari hasil *alignment* tersebut terlihat banyak terdapat kemiripan urutan basanya dari kesembilan bakteri pembandingan kecuali *Xanthomonas campestris* (*out of grup*).





Gambar 1. *Alignment* data urutan basa beberapa spesies *Ralstonia* dan subspecies *Ralstonia syzygii* menggunakan program Multalin

Menurut Frank *et al.* (2008) bahwa semakin banyak bagian yang bervariasi dalam suatu urutan gen maka kelompok filogeninya juga berbeda sedangkan urutan gen yang lestari (*conserved*) dapat dijadikan sebagai primer PCR yang bersifat universal. Tingkat evolusi molekuler sekuen gen *egl* lebih cepat dari sekuen gen 16S rRNA (Yamamoto & Harayama, 1995).

Dalam mendesain pasangan primer spesifik, dipilih urutan basa pada sekuens *R. syzygii* subsp. *syzygii* yang unik dan memiliki perbedaan dengan sekuens DNA yang lain. Perbedaan urutan basa ini akan mengkode protein yang berbeda. Selain itu perlu juga diperhatikan panjang primer. Spesifitas primer biasanya dipengaruhi oleh suhu penempelan dan panjang primer. Panjang primer antara 16–28 basa (Chuan *et al.*, 2013) dengan perbedaan antara primer *forward* dan *reverse* tidak lebih dari 3 basa adalah optimal untuk PCR.

Primer yang berhasil dirancang pada penelitian ini terdiri dari sepasang primer dengan urutan basa 5'-GCTCACCATCGCCAAGGACAGCG-3' dan 5'-TTGATCGAAGCGCTGGTTGAGC-3'.

Primer ini selanjutnya disebut UGM Rss-F (*forward*) dan UGM Rss-R (*reverse*). Karakteristik primer UGM Rss-F/UGM Rss-R antara lain memiliki kandungan GC: 65% (UGM Rss-F) dan 57% (UGM Rss-R), suhu leleh (*Tm*): 62,4°C (UGM Rss-F) dan 58,8°C (UGM Rss-R) dan tidak ada terjadi *secondary structures* (hairpin-dimmer), *complementary* dan *mismatch*. Sifat-sifat tersebut di atas menunjukkan bahwa primer UGM Rss ini bisa digunakan sebagai kandidat primer spesifik yang ideal untuk deteksi gen target (Dieffenbach *et al.*, 1993).

### Amplifikasi DNA *R. syzygii* subsp. *syzygii*

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer spesifik yang telah didesain berdasarkan gen endoglukanase dari *R. syzygii* subsp. *syzygii* yang diunduh dari *GenBank*. Walaupun telah diketahui gambaran tentang suhu penempelan, untuk mengoptimalkan suhu penempelan yang tepat, maka dilakukan PCR gradien. Pengujian dilakukan dengan melakukan PCR dengan beberapa suhu penempelan yang berbeda yaitu: 65,5°C; 64,7°C; 63,4°C; 61,4°C; 59,0°C; 57,0°C; 55,7°C; dan 55,0°C. Dari hasil PCR gradien

ini pada semua suhu yang digunakan dapat tervisualisasi sehingga yang diambil merupakan hasil yang terbaik yaitu pada suhu 59°C. Setelah dilakukan PCR dengan primer spesifik ini (UGMRss-F/UGMRss-R) mampu mendeteksi *R. syzygii* subsp. *syzygii* dengan amplicon berukuran ~378-bp (Gambar 2).

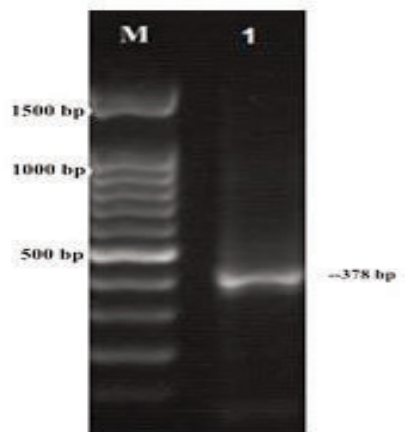
Dalam proses amplifikasi, suhu penempelan merupakan faktor yang sangat penting dalam terjadinya proses penempelan antara primer dengan cetakan (*template*). Suhu penempelan yang terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik sedangkan suhu yang terlalu tinggi menyebabkan sulitnya terjadi ikatan primer. Selain itu konsentrasi DNA cetakan

juga memengaruhi proses penempelan primer (Joko *et al.*, 2011b).

#### Uji Kekhususan dan Kepekaan Primer

Pada uji kekhususan primer, UGMRss-F/UGMRss-R mampu secara spesifik mendeteksi hanya *R. syzygii* subsp. *syzygii* dengan tidak teramplifikasinya DNA dari spesies bakteri lain (Gambar 3). Menurut Yuwono (2006), urutan basa nukleotida pada primer dapat berupa urutan basa nukleotida yang dapat berhibridisasi secara spesifik dengan molekul DNA cetakan. Primer yang didesain berdasarkan sekuens nukleotida yang unik pada *R. syzygii* subsp. *syzygii* menyebabkan primer UGMRss-F/UGMRss-R hanya dapat mendeteksi *R. syzygii* subsp. *syzygii*. Menurut Van Pelt-Verkuit *et al.* (2008), primer merupakan rangkaian basa nukleotida yang berasal dari cetakan atau DNA target dan primer yang baik adalah rangkaian basa nukleotida yang unik pada cetakan tersebut, sehingga tidak terdapat pada sekuens atau lokasi lain pada cetakan.

Hasil uji kepekaan menunjukkan bahwa nilai pengenceran berbanding terbalik dengan nilai konsentrasi DNA. Hasil ini nampak sama dengan visualisasi intensitas DNA pada Gambar 4. Semakin besar pengenceran DNA, intensitas DNA pada gel elektroforesis semakin kecil (tipis). Pada konsentrasi DNA dengan pengenceran hingga 500× (konsentrasi 0,8 ng/ml) masih bisa teramplifikasi dengan primer UGM-Rss (Gambar 4). Pada uji kepekaan primer, target akan tetap pada produk amplicon DNA pada ukuran yang sama akan tetapi berbeda pada ketebalan

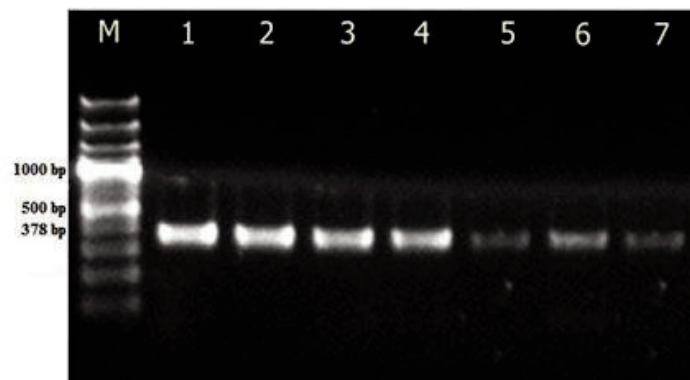


Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi DNA isolat *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik (UGMRss-F/UGMRss-R) dengan amplicon berukuran ~378 pasang basa (M: Marker 100-bp, 1: DNA *R. syzygii* subsp. *syzygii*)



Gambar 3. Visualisasi hasil uji spesifisitas pasangan primer UGMRss-F/UGMRss-R untuk mendeteksi *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* dengan beberapa spesies bakteri pembanding; (1) *R. syzygii* subsp. *syzygii*, (2) *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, (3) *R. pseudosolanacearum*, (4) *Acidovorax citrulli*, (5) *Xanthomonas citri*, (6) *Pantoea stewartii*, (7) *Dickeya chrysanthemi*, (8) *Pectobacterium carotovorum*





Gambar 4. Visualisasi hasil uji kepekaan pasangan primer UGMRss-F/UGMRss-R untuk mengamplifikasi DNA *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* pada berbagai seri pengenceran; 1–7: seri pengenceran 5×, 10×, 20×, 50×, 100×, 200×, dan 500×

dan kejelasan dari hasil visualisasi. Ketebalan band pada ampikon juga memperlihatkan jumlah primer yang berhasil menempel ataupun jumlah cetakan yang berhasil ditemplei oleh primer (Joko *et al.*, 2012).

## KESIMPULAN

Dengan menggunakan data sekuens gen endoglukanase (*egl*) dari *GenBank* dapat dirancang sepasang primer spesifik dan sensitif untuk deteksi *R. syzygii* subsp. *syzygii* yaitu: UGMRss-F (5'-GCT CACCATCGCCAAGGACAGCG-3') dan UGMRss-R (5'-TTCGATCGAACGCCTGGTTGAGC-3') dengan ampikon sebesar ~378-bp.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT Perkebunan Tjengkeh dan Badan Karantina Pertanian, Kementerian Pertanian Republik Indonesia yang telah membiayai sebagian dari penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arwiyanto, T. 2013. *Ralstonia solanacearum*, *Biologi Penyakit yang Ditimbulkan dan Pengelolaannya*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 99 hlm.
- Bennet, C.P.A., P. Hunt, & A. Asman. 1985. Association of a Xylem-Limited Bacterium with Sumatra Disease of Cloves in Indonesia. *Plant Pathology* 34: 487–494.
- Chuan, L.Y., Y.H. Cheng, & C.H. Yang. 2013. Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction. *Biotechnology Letter* 35: 1541–1549.
- Danaatmadja, Y., S. Subandiyah, T. Joko, & C.U. Sari. 2009. Isolasi dan Karakterisasi *Ralstonia syzygii*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 15:7–12.
- Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe, & G.S. Dveksler. 1993. General Concepts for PCR Primer Design. *Genome Research* 3: S30–S37.
- Dwimartina, F., T. Arwiyanto, & T. Joko. 2017. Potential of Endophytic and Rhizobacteria as an Effective Biocontrol for *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*. *Asian Journal of Plant Pathology* 11: 191–198.
- Eden-Green, S.J., R. Balfas, & T. Sutarjo. 1992. Characteristics of the Transmission of Sumatra Disease of Cloves by Tube-Building Cercopoids, *Hindola* spp. *Plant Pathology* 41: 702–712.
- Fegan, M. & P. Prior. 2005. How Complex is The “*Ralstonia solanacearum* Species Complex”, p. 449–461. In C. Allen, A.C. Hayward & P. Prior (eds.), *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. American Phytopathological Society, St Paul.
- Frank, J.A, C.L. Reich, S. Sharma, J.S. Weisbaum, B.A. Wilson, & G.J. Olsen. 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Use for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Enviromental Microbiology* 74: 2461–2470.
- Handiyanti, M., T. Joko, & S. Subandiyah. 2018. Deteksi Molekuler *Burkholderia glumae*, Penyebab Penyakit Hawar Malai Padi. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 22: 98–107
- Ismiyatuningsih, T. Joko, & S. Hartono. 2016. Survey and Detection of *Pectobacterium atrosepticum* in Major Potato-Growing Areas in Central Java Province, Indonesia. *Ilmu Pertanian* 1: 1–6.

- Joko, T., S. Subandiyah, & S. Somowiyarjo. 2000. The Role of Extracellular Protein on the Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 6: 32–38.
- Joko, T., H. Hirata, & S. Tsuyumu. 2007a. Sugar Transporter (MfsX) of Major Facilitator Superfamily is Required for Flagella-Mediated Pathogenesis in *Dickeya dadantii* 3937. *Journal of General Plant Pathology* 73: 266–273.
- Joko, T., H. Hirata, & S. Tsuyumu. 2007b. A Sugar Transporter (MfsX) is Also Required by *Dickeya dadantii* 3937 for in Planta Fitness. *Journal of General Plant Pathology* 73: 274–280.
- Joko, T., D. Kiswanti, S. Subandiyah, & Hanudin. 2011a. Occurrence of Bacterial Soft Rot of *Phalaenopsis* Orchids in Yogyakarta and West Java, Indonesia, p. 255–265. In Y. Koentjoro (ed.), *Proceeding of International Seminar on "Natural Resources, Climate Change, and Food Security in Developing Countries"*, June 27–28, 2011. Surabaya, Indonesia.
- Joko, T., N. Kusumandari, & S. Hartono. 2011b. Optimasi Metode PCR untuk Deteksi *Pectobacterium carotovorum*, Penyebab Penyakit Busuk Lunak anggrek. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 17: 54–59.
- Joko, T., M.P. Koentjoro, S. Somowiyarjo, M.S. Rohman, A. Liana, & N. Ogawa. 2012. Response of Rhizobacterial Communities in Watermelon to Infection with Cucumber Green Mottle Mosaic Virus as Revealed by Cultivation-Dependent RISA. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45: 1810–1818.
- Joko, T., A. Subandi, N. Kusumandari, A. Wibowo, & A. Priyatmojo. 2014. Activities of Plant Cell Wall-Degrading Enzymes by Bacterial Soft Rot of Orchid. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47: 1239–1250.
- Joko, T., M. Umehara, T. Murata, H. Etoh, K. Izumori, & S. Tsuyumu. 2018. Hyperinduction of Pectate Lyase in *Dickeya chrysanthemi* EC16 by Plant-Derived Sugars. *Journal of Plant Interactions* 13: 141–150.
- Liu, H., S. Zhang, M.A. Schell, & T.P. Denny. 2005. Pyramiding Unmarked Deletions in *Ralstonia solanacearum* Shows that Secreted Proteins in Addition to Plant Cell-Wall-Degrading Enzymes Contribute to Virulence. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 1296–1305.
- Mahfut, T. Joko, & B.S. Daryono. 2016. Molecular Characterization of Odontoglossum Ring Spot Virus (ORSV) in Java and Bali, Indonesia. *Asian Journal of Plant Pathology* 10: 9–14.
- Nurjanah, N., T. Joko, & S. Subandiyah. 2017. Characterization of *Pantoea ananatis* Isolated from Garlic and Shallot. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 21: 120–126.
- Poretsky, R., L.M. Rodriguez-R, C. Luo, D. Tsementzi, & K.T. Konstantinidis. 2014. Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLoS ONE* 9: e93827.
- Roberts, D.P., T.P. Denny, & M.A. Schell. 1988. Cloning of the *egl* Gene of *Pseudomonas solanacearum* and Analysis of Its Role in Phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology* 170: 1445–1451.
- Schaad, NW, J.B. Jones, & W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed. American Phytopathological Society, St Paul. 373 p.
- Safni, I., I. Cleenwerck, P.D. Vos, M. Fegan, L. Sly, & U. Kappler. 2014. Polyphasic Taxonomic Revision of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex: Proposal to Emend the Descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and Reclassify Current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* Phylotype IV Strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., Banana Blood Disease Bacterium Strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* Phylotype I and III Strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 3087–3103.
- Safni, I., S. Subandiyah, & M. Fegan. 2018. Ecology, Epidemiology and Disease Management of *Ralstonia syzygii* in Indonesia. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–11.
- Suharti, T., T. Joko, & T. Arwiyanto. 2017. Deteksi Bakteri Patogen Terbawa Benih Akor (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 17: 19–36.
- Trianom, B., T. Arwiyanto, & T. Joko. Morphological and Molecular Characterization of Sumatra Disease of Clove in Central Java, Indonesia. *Tropical Life Sciences Research (In Press)*.
- Van Pelt-Verkuil, E., A. Van Belkum, & J.P. Hays. 2008. *Principals and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer, Netherland. 30 p.

- Widyaningsih, S., S.N.H. Utami, T. Joko, & S. Subandiyah. 2017. Development of Disease and Growth on Six Scion/Root Stock Combinations of Citrus Seedlings under Huanglongbing Pressure. *Journal of Agricultural Science* 9: 229–238.
- Windari, U., T. Joko, & S. Subandiyah. 2015. Deteksi Penyakit *Bacterial Fruit Blotch* pada Melon Menggunakan ELISA. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 19: 1–5.
- Yamamoto, S. & S. Harayama. 1995. PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1104–1109.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta. 246 hlm.